

**SYNOVIAL CELL PROLIFERATION SUPPRESSANT AND THERAPEUTIC AGENT  
FOR CHRONIC ARTICULAR PHEUMATISM**

**Publication number:** JP7145062  
**Publication date:** 1995-06-06  
**Inventor:** HIGAKI MEGUMI; SAKANE TAKESHI; MIZUSHIMA YUTAKA  
**Applicant:** L T T KENKYUSHO KK  
**Classification:**  
- international: **A61K31/59; A61P29/00; A61P43/00; A61K31/59; A61P29/00; A61P43/00; (IPC1-7): A61K31/59; A61K31/59**  
- european:  
**Application number:** JP19930304268 19931203  
**Priority number(s):** JP19930304268 19931203; JP19930243118 19930929

Report a data error here

**Abstract of JP7145062**

**PURPOSE:** To obtain the subject safe and effective suppressant containing at least one kind selected from vitamin D3 and its derivatives. **CONSTITUTION:** This synovial proliferation suppressant comprises at least one kind selected from vitamin D3 and its derivatives. Vitamin D3, which is the main component constituting vitamin Ds found in foods such as fish liver, fish meat, butter or yolk, is isolated from these foods. Also, vitamin D3, when taken in vivo, is metabolized into activated type 1,25-hydroxycholecalciferol and exhibits physiological activity. The therapeutic agent for chronic articular rheumatism contains this preparation as active ingredient. The dose of this therapeutic agent is  $\geq 0.0125$ -1.0  $\mu$ g a day per adult in terms of vitamin D3 or its derivative.

---

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-145062

(43) 公開日 平成7年(1995)6月6日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 31/59	ABG	9454-4C		
	ADS			
	AED			

審査請求 未請求 請求項の数2 O L (全 5 頁)

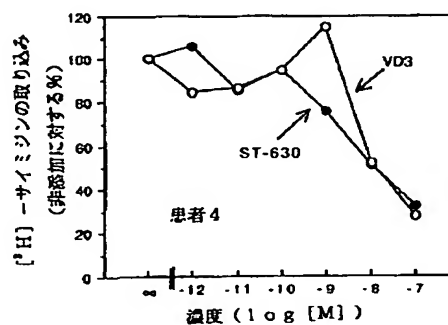
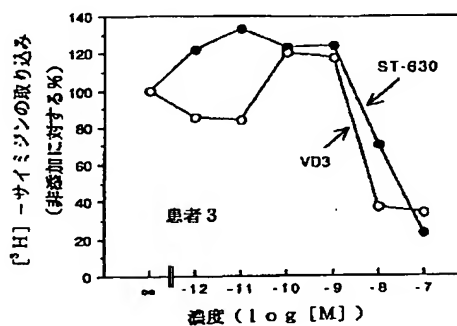
(21) 出願番号	特願平5-304268	(71) 出願人	391043055 株式会社エルティーティー研究所 神奈川県川崎市宮前区菅生2-16-1
(22) 出願日	平成5年(1993)12月3日	(72) 発明者	桒垣 恵 東京都目黒区青葉台4丁目4番26号 青葉台ハイツ503号
(31) 優先権主張番号	特願平5-243118	(72) 発明者	坂根 剛 神奈川県川崎市麻生区王禅寺747番地24号
(32) 優先日	平5(1993)9月29日	(72) 発明者	水島 裕 東京都世田谷区梅ヶ丘1丁目1番11号
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(74) 代理人	弁理士 遠山 勉 (外2名)

(54) 【発明の名称】 滑膜細胞増殖抑制剤及び慢性関節リウマチ治療剤

(57) 【要約】

【目的】 有効かつ安全な滑膜細胞増殖抑制剤及び慢性関節リウマチの治療剤を提供すること。

【構成】 ビタミンD<sub>3</sub>及び／又はその誘導体からなる滑膜細胞増殖抑制剤を慢性関節リウマチ治療剤の有効成分とする。



## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ビタミンD<sub>3</sub>及びその誘導体から選ばれる 1 種又は 2 種以上からなる滑膜細胞増殖抑制剤

【請求項 2】 請求項 1 記載の滑膜細胞増殖抑制剤を有効成分として含有する慢性関節リウマチ治療剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、滑膜細胞増殖抑制剤及び慢性関節リウマチ治療剤に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis) は、関節滑膜を炎症の主座とし、軟骨や骨の破壊を引き起こす原因不明の慢性疾患である。慢性関節リウマチの滑膜組織には、リンパ球浸潤、血管新生とともに滑膜細胞の増殖を伴う滑膜表層の重層化が認められる。軟骨、骨に浸潤するパンヌスと呼ばれる肉芽組織では、マクロファージ様の A 型滑膜細胞とともに線維芽細胞様の B 型滑膜細胞の増殖が著明である。

【0003】 一方、滑膜局所からは種々のサイトカインが検出され、血管増生、好中球、活性化 T 細胞、マクロファージという炎症細胞の走化、集積、B 細胞の抗体産生、骨吸収による関節破壊などの組織障害に加えて、滑膜細胞増殖にこれらのサイトカインが働くと考えられる。

【0004】 以上の知見から、滑膜細胞の増殖を阻害することができれば、慢性関節リウマチの対症的な治療が可能になると考えられる。しかしながら、滑膜細胞の増殖を抑制する物質はほとんど知られておらず、わずかにステロイド系の薬剤が高濃度で抑制作用を有することが知られているが、その作用は十分でなく、副作用等の問題もあって、実用的な治療方法は知られていないのが現状である。

【0005】 ところで、ビタミンD<sub>3</sub>はコレカルシフェロールとも呼ばれ、魚類の肝、魚肉、バター、卵黄等の食品に含まれるビタミンDを構成する主要な成分であり、摂取されると小腸、腎、骨等の標的器官に運ばれて、カルシウム代謝に関与するタンパクの合成を促進し、生理活性を発現することが知られている。この生理活性としては、小腸粘膜上皮細胞へのカルシウム、リン酸の吸収促進、腎の尿細管上皮細胞へのカルシウム、リン酸の再吸収促進、骨での骨塩の動員促進、類骨組織の石灰化等が知られており、これらの生理作用によって、生体のカルシウム及びリンの代謝平衡の維持を行っている。

【0006】 また、ビタミンD<sub>3</sub>は単球の前駆細胞に対して増殖を抑制し、マクロファージへの分化を促進すること (Abe, E., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 4990-4994, 1981; Hozumi, M., Adv. Cancer Res., 38, 121-169, 1983; Suda, T., et al., in Vitamin D, Basic and Clinical Aspects (ed. by Kumar, R), Martinus Nijhoff P

ublishing, p. 343-363, 1984) が知られている。さらに、最近、抗腫瘍効果が知られるようになり、ビタミンD<sub>3</sub>を主成分とする薬剤が開発されている。しかしながら、ビタミンD<sub>3</sub>が滑膜細胞に対してどのような作用を有するかについては知られていない。

## 【0007】

【発明が解決しようとする課題】 上記のように、現状では慢性関節リウマチの実用的な治療方法は知られておらず、有効な治療薬が望まれている。本発明は、かかる観点からなされたものであり、有効かつ安全な滑膜細胞増殖抑制剤及び慢性関節リウマチの治療剤を提供することを課題とする。

## 【0008】

【課題を解決するための手段】 本発明者は、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、ビタミンD<sub>3</sub>及びその誘導体が滑膜細胞の増殖を抑制する作用を有することを見だし、本発明に至った。

【0009】 すなわち本発明は、ビタミンD<sub>3</sub>及びその誘導体から選ばれる 1 種又は 2 種以上からなる滑膜細胞増殖抑制剤、及びこの滑膜細胞増殖抑制剤を有効成分として含有する慢性関節リウマチ治療剤である。以下、本発明を詳細に説明する。

## 【0010】 &lt;1&gt;滑膜細胞増殖抑制剤

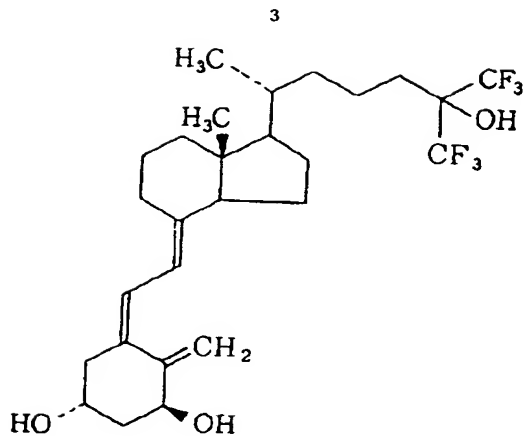
本発明の滑膜細胞増殖抑制剤は、ビタミンD<sub>3</sub>及びその誘導体から選ばれる 1 種又は 2 種以上からなる。ビタミンD<sub>3</sub>は、魚類の肝、魚肉、バター、卵黄等の食品に含まれるビタミンDを構成する主要な成分であり、これらの食品から単離することができる。さらに、ビタミンD<sub>3</sub>の誘導体も同様に本発明に使用することができる。

【0011】 また、ビタミンD<sub>3</sub>は、体内に摂取されると活性化型の 1, 25-ジヒドロキシコレカルシフェロールに代謝されて生理活性を発揮する。本発明においては、上記ビタミンD<sub>3</sub>の誘導体とはこのような活性化型も含み、さらに、これらの生理学上許容される塩も含まれる。

【0012】 ビタミンD<sub>3</sub>の誘導体としては、例えば化 1 で表される ST-630 等が挙げられる。ST-630 は、ビタミンD作用が強い活性化型ビタミンD<sub>3</sub>誘導体として知られている (M. Inaba et al., Arch. Biochem. Biophys. 258, 421-425, 1987)。

## 【0013】

## 【化 1】



【0014】上記の化合物のうち、1, 25-ジヒドロキシコレカルシフェロールは市販されているので、それを使用してもよい。また、ST-630は、大正製薬株式会社及び住友製薬株式会社から入手できる。

【0015】＜2＞慢性関節リウマチ治療剤  
本発明の慢性関節リウマチ治療剤は、上記滑膜細胞増殖抑制剤を有効成分として含有するものであり、滑膜細胞増殖抑制剤以外に、薬剤学的に許容される担体を基剤として用いてもよい。担体としては、具体的には、結晶性セルロース、ゼラチン、乳糖、澱粉、植物性および動物性脂肪および油、ガム、ポリアルキレングリコール等が挙げられる。この場合、製剤全量に対するビタミンD<sub>3</sub>及びその誘導体の配合量は、10<sup>-4</sup>～10<sup>-7</sup>重量%が好ましい。

【0016】また、本発明の治療剤は、経口、経腸または経静脈投与による製剤のいずれの製剤も適用できる。具体的剤型としては、錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤、座薬、軟膏剤等、さらには関節腔内注入剤などの注射剤等が挙げられる。

【0017】さらに、本発明の慢性関節リウマチ治療剤は、ビタミンD<sub>3</sub>及び／又はその誘導体以外の医薬であって混和できるもの、例えばデンプン、マンニトール、乳糖等の賦形剤、カルボキシメチルセルロースナトリウム

(組成)

ビタミンD <sub>3</sub> 及び／又はその誘導体	0.5 μg
乳糖	148 g
コーンスターチ	50 g
ステアリン酸マグネシウム	1.5 g

【0023】(製法) 上記成分を細かく粉末にし、均一な混合物になるように十分攪拌した後、これを0.2 g づつゼラチンカプセルに充填し、カプセル剤とする。

【0024】

【製造例3】 水性懸濁剤

(組成)

ビタミンD <sub>3</sub> 及び／又はその誘導体	1 μg
カルボキシメチルセルロースナトリウム	35 mg
ポリソルベート80	25 mg
ベンジルアルコール	70 mg

ム、ヒドロキシプロピルセルロース等の結合剤、結晶セルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム等の滑沢剤、軽質無水ケイ酸等の流動性向上剤等を適宜組み合わせることを含んでもよい。

【0018】本発明の治療剤の投与量は、年齢及び患者の症状等によっても異なるが、通常は、ビタミンD<sub>3</sub>及び／又はその誘導体の量として、成人1日当たり0.0125～1.0 μg 以上であり、好ましくは0.125～0.5 μg である。この範囲で使用するにより、所期の効果が期待でき、上記範囲の量を1日1～3回に分けて投与するのが好ましい。また、関節腔内注入剤は、水性懸濁注射液として用い、投与間隔は2～4週間とするのが好ましい。

【0019】

【実施例】 以下に、本発明の実施例を説明する。

【0020】

【製造例1】 錠剤

(組成)

ビタミンD <sub>3</sub> 及び／又はその誘導体	1 μg
乳糖	140 g
結晶セルロース	25 g
トウモロコシ澱粉	25 g
3%ヒドロキシプロピルセルロース水溶液	100 ml
ステアリン酸マグネシウム	2 g

【0021】(製法) ビタミンD<sub>3</sub>及び／又はその誘導体に、乳糖、結晶セルロース及びトウモロコシ澱粉を60メッシュのふるいで篩過し、均一に混合した後、練合機に投入し、3%ヒドロキシプロピルセルロース水溶液を注加して練合する。ついで、16メッシュのふるいで造粒し、50℃で送風乾燥する。乾燥後、16メッシュのふるいを通して整粒を行い、ステアリン酸マグネシウムを混合し、打錠機で重量薬200 mg の錠剤にする。

【0022】

【製造例2】 カプセル剤

ビタミンD <sub>3</sub> 及び／又はその誘導体	0.5 μg
乳糖	148 g
コーンスターチ	50 g
ステアリン酸マグネシウム	1.5 g

注射用精製水 (全体として) 100 ml

【0025】(製法) 上記成分を半量の注射用精製水に攪拌しながら加え、十分攪拌した後、残りの半量の注射用精製水を加えて再び攪拌する。約1時間攪拌後、1 ml の容量に充填し、関節腔内用の水性懸濁剤とする。

【0026】(本発明の滑膜細胞増殖抑制剤の評価)

<1>滑膜細胞増殖抑制作用

慢性関節リウマチ患者8人(患者1～8)及び変形性関節症患者2人(患者9、10)について、膝関節置換術時に得られた生検滑膜より滑膜細胞を調製し、この細胞

を用いて本発明の滑膜細胞増殖抑制剤の評価を行った。

【0027】(1) 使用した細胞

滑膜細胞は次のようにして調製した。TKR (Total knee replacement) 手術によって得た患者の膝関節滑膜の脂肪部を除去し、組織を細かく切削した後、組織細胞分散酵素溶液ディスパーソル (Dispersol: collagenase/D Nase, IBL社) で、37℃、1時間酵素処理を行って、滑膜細胞を分散させた。

【0028】分散させた細胞を、メッシュに通し単一細胞にした後、RPMI-1640培地で洗滌した。得られた細胞懸濁液をフィコール (株式会社ナカライ製) を用いた濃度勾配に重層、遠心分離することにより単核球分画を回収した。これを再び洗滌した後、無血清培地 (1% ITS Premix (コラボレイティブ リサーチ社製) 添加RPMI-1640培地) に、 $4 \times 10^5$  個細胞/ml となるように懸濁した。

【0029】一方、コントロールには、ヒト線維芽細胞株としてWI38細胞及びトランスフォームしたWI38細胞VA13株、ウサギ滑膜細胞株としてHig82細胞を用いた。

【0030】(2) 滑膜細胞増殖に対するビタミンD<sub>3</sub>及びその誘導体の影響

5～8回継代した滑膜細胞を、20%ウシ血清アルブミン、100μg/ml ペニシリン/ストレプトマイシン、100μM レーグルタミンを含むRPMI164

0培地に、 $2 \times 10^5$  個/ml となるように懸濁し、96ウェルプレートに100μl づつ播種した。同時に、 $10^{-6} \sim 10^{-11}$  Mの種々の濃度の活性化型ビタミンD<sub>3</sub> (1,25-ジヒドロキシコレカルシフェロール) あるいはST630を添加した。

【0031】48時間後に、1μCi/ウェルの<sup>3</sup>H-サイミジン (70Ci/mmol) を加え、16時間後に細胞に取り込まれた<sup>3</sup>Hの放射活性を液体シンチレーションカウンタで測定した。尚、培養中に浮遊細胞はほとんど認められず、トリパンブルー染色によってもほとんどの細胞が死滅していないことが確認された。

【0032】各種濃度で活性化型ビタミンD<sub>3</sub>及びST630を添加したときに滑膜細胞に取り込まれた<sup>3</sup>Hの放射活性の、ビタミンD<sub>3</sub>あるいはST630を添加しなかったときの放射活性に対する割合 (%) を、図1に示す。

【0033】また、表1に、50%増殖阻害濃度 (IC<sub>50</sub>: <sup>3</sup>Hの取り込みが、活性化型ビタミンD<sub>3</sub>及びST630を加えなかったときの取り込みの50%となるときの濃度)、及び活性化型ビタミンD<sub>3</sub>及びST630を加えなかったときの取り込みを示す。

【0034】

【表1】

細胞	50%増殖阻害濃度 (IC <sub>50</sub> ) (nM)		ビタミンD <sub>3</sub> 及びST630を加えなかったときの <sup>3</sup> Hの取り込み (cpm)
	ST-630	活性化型ビタミンD <sub>3</sub>	
患者1	31	>100	2579
患者2	29	38	3833
患者3	26	6.8	3483
患者4	10	12	3857
患者5	15	6.6	2687
患者6	22	22	1965
患者7	52	30	1476
患者8	34	94	2624
患者9	67	46	1277
患者10	44	31	994
Hig82	>100	>100	1333
WI38	>100	>100	13404
WI38VA13	>100	>100	2765

【0035】以上の結果から、本発明に用いるビタミンD<sub>3</sub>及びその誘導体は、ほとんどの患者の滑膜細胞の増殖に対して抑制作用があることが明らかである。また、この抑制作用は、特に慢性関節リウマチ患者の滑膜細胞

に対して低濃度で働く。さらに、線維芽細胞系には増殖抑制作用をほとんど示さない。

【0036】<2>サイトカイン抑制作用

上記と同様にして調製した慢性関節リウマチ患者の滑膜

細胞を、種々の濃度の活性化型ビタミンD<sub>3</sub> ( $10^{-9} \sim 10^{-7}$ ) を含む20%血清含有RPMI培地で2日間培養した。3日目に同濃度の活性化型ビタミンD<sub>3</sub>を含む無血清培地に交換した後、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  LPSを添加し、その24時間後に培地を含む細胞を3回凍結-融解して細胞を破砕した。これを遠心分離して上清を得た。

【0037】上記のようにして得られた上清のインターロイキン1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) を、抗IL-1 $\beta$ モノクローナル抗体を用いたELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) キット (大塚アッセイ製) で定量した。上記患者4で得られた結果を図2に示す。

【0038】この結果から、ビタミンD<sub>3</sub>が滑膜細胞におけるIL-1 $\beta$ の産生量を抑制することが明らかであり、この作用からも滑膜細胞の増殖及び活性化を抑制す

るものと考えられる。

【0039】

【発明の効果】本発明の滑膜細胞増殖抑制剤は、滑膜細胞に特異的に増殖抑制効果を有するので、これを含有する慢性関節リウマチ治療剤は、慢性関節リウマチの治療に有効であると期待される。

【図面の簡単な説明】

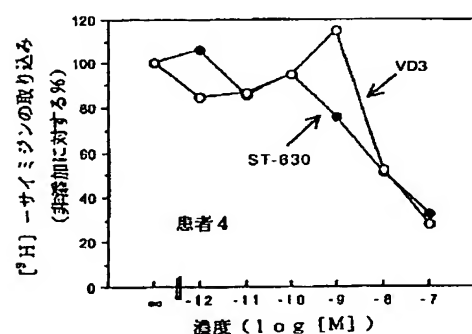
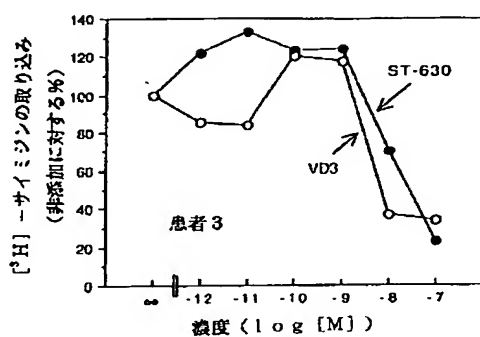
【図1】 活性化型ビタミンD<sub>3</sub>又はその誘導体存在下での滑膜細胞の増殖を示す図。

10 【図2】 活性化型ビタミンD<sub>3</sub>によるIL-1 $\beta$ の抑制を示す図。

【符号の説明】

図中、VD3は、活性化型ビタミンD<sub>3</sub>を表す。

【図1】



【図2】

